

DT07 Rec'd PCT/PTO 26 JUL 2004

#NDTG
PCT

PATENT
0230-0160P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Kenji ASANO et al. Conf.:
Appl. No.: 09/856,716 Group: Unassigned
Filed: May 25, 2001 Examiner: Unassigned
For: LAK ACTIVITY-SCREENING MATERIALS CONTAINING
LENTINUS EXTRACT OF EDODES MYCELIUM AND LAK
ACTIVITY-SCREENING METHODS USING THE EXTRACT

RENEWED PETITION UNDER 37 C.F.R. § 1.47(a)

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

July 26, 2004
(Monday)

Sir:

Pursuant to the Decision on the Petition issued on May 25, 2004, attached hereto is Petition Under 37 §1.47(a), wherein acceptance of the Declaration and Power of Attorney without the signature of Inventor TAJIMA is requested.

As detailed in the Petition and the evidence attached thereto, Mr. TAJIMA considers himself to be an inventor of the subject matter of the present application, but has refused to execute the Declaration and Power of Attorney.

The Decision on Petition mailed on May 25, 2004, indicates that requirement (2) of the Petition, i.e. proof that the inventor refuses to sign had not been satisfied. The Decision stated that the Petition was inadequate because inventor TAJIMA

had not been sent the Declaration & Power of Attorney with the complete specification and there was no express statement that Mr. TAJIMA did not want to receive the application papers. These issues have been addressed in the attached Petition, wherein it is shown that Mr. TAJIMA has now been sent the Declaration & Power of Attorney with the complete application and that he expressly refused to execute the Declaration & Power of Attorney and returned the application papers to the Japanese counsel.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. §§1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

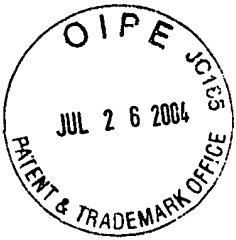
BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By ma
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

MaryAnne Armstrong, PhD, 40,069

GMM/MAA/
0230-0160P
Attachments: Petition

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000



PATENT
0230-0160P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Kenji ASANO et al. Conf.:
Appl. No.: 09/856,716 Group: Unassigned
Filed: May 25, 2001 Examiner: Unassigned
For: LAK ACTIVITY-SCREENING MATERIALS CONTAINING
LENTINUS EXTRACT OF EDODES MYCELIIUM AND LAK
ACTIVITY-SCREENING METHODS USING THE EXTRACT

PETITION UNDER 37 C.F.R. § 1.47(a)

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

July 26, 2004
(Monday)

Sir:

1. This petition is to declare that the non-signing inventor refuses to sign the oath or declaration after having been presented with the same.

Attached hereto is an affidavit of Dr. Hiroko EJIRI, of the Japanese law firm YUASA & HARA. Dr. EJIRI states that inventor Yutaka TAJIMA was sent the Declaration & Power of Attorney, and a copy of the complete specification, including the claims on July 9, 2004, which was delivered on July 12, 2004. In a telephone conversation that took place on July 12, 2004, Mr. TAJIMA informed Dr. Ejiri that he would not execute the Declaration & Power of Attorney and returned all of the

documents to the offices of YUASA & HARA. Thus, inventor TAJIMA has been presented with the Declaration & Power of Attorney with the complete specification and has explicitly refused to execution the Declaration & Power of Attorney.

2. Attached hereto as an acceptable oath or declaration in compliance with 35 U.S.C. §§ 115 and 116.

3. Fee Payment (37 C.F.R. § 1.17(i))

☒ The surcharge fee in the amount of \$130.00 was paid on May 25, 2001. As noted on the Decision mailed on May 25, 2004, no additional fee is needed.


4. Statement of non-signing inventor's last known address:

Yutaka TAJIMA
10-511, Yaemizo 3-chome
Saga-shi, Saga 849-0935 JAPAN

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. §§1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By 
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

MaryAnne Armstrong, PhD #40,069

GMM/MAA/
0230-0160P

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachments: Declaration of Dr. Hiroko EJIRI
Declaration and Power of Attorney



IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: ASANO, Kenji et al. Conf.: Unassigned
Int'l. Appl. No.: PCT/JP99/06615
Appl. No.: 09/856,716 Group: Unassigned
Filed: May 25, 2001 Examiner: Unassigned
For: LAK ACTIVITY-SCREENING MATERIALS
CONTAINING LENTINUS EXTRACT OF EDODES
MYCELIUM AND LAK ACTIVITY-SCREENING
METHODS USING THE EXTRACT

AFFIDAVIT

I, Hiroko Ejiri, do so solemnly swear that a Declaration and Power of Attorney in connection with Application No. 09/856,176, filed in the U.S. Patent and Trademark Office on May 25, 2001, a copy of the complete specification and claims and a copy of the corresponding WO 00/33069 were presented to Yutaka Tajima, one of the inventors of the above-identified application by mailing the documents to his last known address on July 9, 2004. A copy of the letter, which accompanied the documents, and the envelope attached hereto as Exhibit 1. An English translation of the letter is attached hereto as Exhibit 2. A certificate of delivery of mail was issued on July 12, 2004 by Hongo Post Office of the Japanese Postal Service, confirming that Yutaka TAJIMA actually received the letter on July 12, 2004 (Exhibit 3). Yutaka TAJIMA gave me a phone call on July 12, 2004. In the phone call, he told me that he rejected my request to sign the document and, then, I requested Yutaka TAJIMA to return the whole letter including a Declaration and Power of Attorney, a copy of the complete specification and claims, and a copy of the corresponding WO 00/33069 using the

enclosed return-mail envelope. I received the letter sent by Yutaka TAJIMA on July 13, 2004 (Exhibit 4).

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Dated this 15th day of July 2004

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Hiroko Ejiri', is written above a horizontal line.

Hiroko Ejiri

16

7.12 July 12, 2004

東京
本郷四

16

〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
-0004 新大手町ビル206区ユアサハラ法律特許事務所
電話 03 (3270) 6641 (大代表)

弁護士 江尻ひろ子

Dr. Hiroko Ejiri, Patent Attorney
YUASA AND HARA
New Ohtemachi Bldg. 206
2-1, Ohtemachi 2-chome,
Tokyo 100-0004 Japan

S

小包追跡システムで配達状況がわかります。
<http://www.post.yusei.go.jp>
フリーダイヤル 0120-232886
(平日 8:00~20:00、土日休日 9:00~17:00)

お問い合わせ小包番号

14-6100-31450

お届け先おなまえ

江尻ひろ子様

年 月 日

配達時間帯指定		指定なし
午前	午後	
9~12時頃	13~16時頃	
夕方	夜間	
17~19時頃	19~21時頃	

摘要 着札
510+20

●普通小包の損害賠償額は六千円を限度とする実損額です。
●さらに補償が必要な場合は書留小包をご利用ください。
●お問い合わせは郵便局又は郵便サービス案内センター(☎0120-232886)へお願いします。

郵便局



a 1 4 6 1 0 0 3 1 4 5 0 a

料金着払

(郵便物の料金) (手数料) (合計)

510 円 + 20 円 = 530 円

Postal Fee ¥530
Paid on delivery

BEST AVAILABLE COPY

Exhibit 3

(Translation)

To: YUASA AND HARA, 2-1, Ohtemachi 2-chome
From: 113-8799 Hongo Post Office

Certificate of Delivery of Mail

Addressee: Mr. Yutaka TAJIMA

Mail Number: 101-31-03537-5

This is to certify that the above-identified mail
was duly delivered on July 12, 2004.

113-8700 Hongo Post Office

(seal with date,
2004.7.12)

契 16.7.12 印 Exhibit 3
12-18

郵便物配達証明書

受取人の 氏 名	田 島 裕 様
引受番号	101-31-03537-5 号
上記の郵便物は、16年 7 月 12 日 配達したのでこれを証明します。	
113-8799 都 府 県 本 郷 郵便局 16.7.12 12-18 印	

再生紙使用

7-07370 (15・HIN)

郵便はがき

1100-0004

通信事務

大井町 2-2-1

こたけく

法政大学経済学部様

113-8799

本 郷

郵便局

1100-0004

EXPRESS

速達

849-0935
佐賀市八戸溝 3-10-511

田 島 裕 様

To Mr. Yutaka TAJIMA
10-511 Yaemizo 3-chome
Saga-shi, Saga 849-0935

配達証明

書留

Registered
Required certificate of delivery

BEST AVAILABLE COPY

Exhibit 2

(Translation)

Mr. Yutaka Tajima

Hiroko Ejiri, Patent Attorney
YUASA AND HARA
New Ohtemachi Bldg. 206
2-1, Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004
Tel: (03)3270-6641
Fax: (03)3246-0233

Re: U.S. Patent Appln. Ser. No. 09/856,716
"LAK ACTIVITY-SCREENING MATERIALS CONTAINING
LENTINUS EXTRACT OF EDODES MYCELIUM AND LAK
ACTIVITY-SCREENING METHODS USING THE EXTRACT"
Our File: PC/K(X)-17-20US

Dear Mr. Tajima:

The above-identified U.S. patent application is still pending without completing your signature on the Declaration and Power of Attorney. We have just received an Office Action of May 25, 2004 refusing the documents already submitted to the U.S. PTO in this regard.

The Examiner pointed out the incompleteness of formalities in this application because of absence of your signature on the Declaration and Power of Attorney. We, therefore, send to you a package including a Declaration and Power of Attorney, a complete copy of the specification and claims, and a copy of the corresponding PCT application.

We would ask you to execute the enclosed Declaration and Power of Attorney and return the documents to Dr. H. Ejiri, YUASA

& HARA, with the envelope also enclosed with her address stamped.

The due date to respond to the outstanding Office Action expired on July 25, 2004. Please return the documents by July 23, 2004 at the latest.

If, however, you refuse to sign the Declaration, please let us know and return the documents as they are.

Yours very truly,

Documents Enclosed: Specification and Claims
Declaration and Power of Attorney
PCT Application Document
Return-mail Envelope

平成 1 6 (2004) 年 7 月 9 日

田島 裕 様

(写：小林製薬株式会社 藤本 英樹 様)
株式会社長岡 L・E・M 研究所 澤田石 英雄 様)

ユアサハラ法律特許事務所

〒100-0004

東京都千代田区大手町 2 - 2 - 1

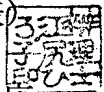
新大手町ビル 206 区

TEL: (03) 3270-6641 (大代表)

FAX: (03) 3246-0233 (代表)

弁理士 江尻 ひろ子

担当 弁理士 深澤 憲広



アメリカ特許出願 No. 0 9 / 8 5 6 , 7 1 6

名 称： シイタケ菌糸体抽出物を含有する LAK 活性スクリーニング物質及びそれを用いた LAK 活性スクリーニング

当所ファイル： P C / K (X) - 1 7 - 2 0 U S

拝 啓 突然のご連絡をお許し下さい。

標記のアメリカ出願につきましては、出願書類に貴殿のサインを戴けないまま今日までできております。今回アメリカ特許庁から 2004 年 5 月 25 日付で方式不備を指摘した指令が出されました。

今回の指令は、出願時に提出の宣誓書に貴殿のサインがなされていないため、方式的に認められないというものです。この方式不備を解消するために貴殿のサインを戴きたく、改めて出願書類一式（明細書・国際出願公開公報・宣誓書）をお送り申し上げます。同封書類末尾に添付の宣誓書に貴殿のサインをご記入の上ご返送願います。

今回の指令に対する現地応答期限は 2004 年 7 月 25 日です。お手数ですが本年 7 月 23 日までに当所に到着するようお送り下さいますようお願い致します。

なお、依然としてサインを拒否なさる場合には、その旨を表示して、お送りした書類をそのままご返送下さい。

敬 具

同封書類： 出願書類一式・宣誓書
ユアサハラ宛封筒



SPECIFICATION

LAK ACTIVITY-SCREENING MATERIALS CONTAINING LENTINUS EXTRACT OF EDODES MYCELIUM AND LAK ACTIVITY-SCREENING METHODS USING THE EXTRACT

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of tumor immunology. Specifically, the present invention relates to materials and methods for screening immunotherapeutic agents having an antitumor and/or anticancer activity.

- 10 More specifically, the present invention relates to screening materials and methods for determining in vitro whether or not an LAK (Lymphokine Activated Killer) cell activity-enhancing effect can be obtained in vivo.

15 PRIOR ART

- It is well known in the field of tumor immunology, that tumor cells contain tumor antigens. Tumor antigens expressed by tumor cells include tumor-specific antigens (TSA) which are expressed in tumor cells but not in normal
- 20 cells, and tumor-associated antigens (TAA) which are expressed in normal cells as well as tumor cells, but at very low levels unless they are upregulated by malignant transformation. These tumor antigens are newly expressed when genetic alteration takes place as a result of
- 25 malignant transformation of normal cells or as a result of variation in expression regulation resulting from such genetic alteration. The most commonly employed therapy for treating cancer in which tumor cells exist which have an

altered antigenic expression is immunotherapy. This kind of therapy may involve either the immunization of a patient with a tumor antigen or the use of a drug which enhances the patient's immune function. It is now accepted that among the various cells functional in the immune system, Nk (natural killer) cells exhibit a particularly potent anti tumor-cell effect. It is also recognized that NK cell activity can be enhanced by employing immunotherapy. NK cells are non-T/non-B cytotoxic lymphocytes present in normal individuals, and they are known to have a MHC antigen-nonrestricted cytotoxicity effect against not only tumor cells, but also virus-infected cells and other cells which do not express or decrease expressing MHC class I molecules. However, there have now been identified tumor cells resistant to even NK cells.

Dr. S. Rosenberg of the National Cancer Institute (NCI) in the US found that incubation of peripheral lymphocytes with interleukin 2 (IL-2) can induce the production of killer cells showing cytotoxicity against a wide range of target cancer cells including autologous cancer cells and that these killer cells can kill even NK cell-resistant cancer cells, (see Japanese Patent Public Disclosure No. 116518/87). These killer cells were named lymphokine activated killer (LAK) cells. LAK cells do not consist of a cytologically homogeneous population and are known to include NK cells and killer T-cells. Recently, adoptive immunotherapy has been attempted wherein peripheral lymphocytes from a subject are activated with

IL-2 in a cell culture system and then LAK cells showing antitumor activity are reinfused into the subject (LAK therapy). It has been reported that remission from terminal cancer has been achieved or tumor growth-inhibited by the use of adoptive immunotherapy involving repeated administration of such LAK cells. However, LAK therapy exerts different effects in different individuals and sometimes has almost no effect. It also involves a number of problems such as the physical stress imposed on the subject associated with the isolation of a great number of leukocytes from the patient, the high cost of performing mass culture of isolated leukocytes, etc, and moreover, LAK therapy involving direct administration of IL-2 causes serious side effects due to the administration of IL-2 at a high concentration.

Specifically, it is known that LAK adoptive immunotherapy using IL-2 causes side effects such as general prostration, chills, fever, hypoalbuminemia, anemia, eosinophilia and that these side effects are more serious than those caused by administration of IL-2 alone. More notably, some important side effects are associated with the cytotoxicity of LAK cells against normal cells. It is also reported that such cytotoxicity of LAK cells against hematopoietic stem cells induces anemia and thrombocytopenia, as well as causing in vitro damage to lymphocytes, macrophages and vascular endothelial cells. Moreover, IL-2 administered via the oral route is poorly absorbed and must therefore mainly be administered via

injection for direct administration at the present time.

Thus, it would be desirable to determine in vitro whether or not LAK activity can be enhanced by direct administration and to avoid the application of LAK therapy which is liable to cause side effects because of the uncertainty of the effects. However, screening in vitro using IL-2 has the disadvantage of being too expensive.

Some bacteria, foods and other naturally occurring substances are known to have anticancer properties.

10 Bacteria and food-type substance are preferential for use as anti-cancer agents due to their generally benign nature and low sideeffect profile. Many attempts have been made to cure cancer by using bacteria, as shown in reports relating to Coley's toxin consisting of a culture filtrate of *Serratia marcescens* and *Streptococcus pyogenes* (1964); treatment of leukemia with BCG (Mathe, G., Adv. Cancer Res., 14, 1, 1971); tumor regression in guinea pigs (Zbar, B., et al., J. Natl. Cancer Inst., 48, 831, 1971); and effectiveness of administration of yeast cell wall polysaccharide against transplanted tumor cells such as sarcoma 180, for example.

Especially, a great amount of research has been conducted into the anticancer effect of polysaccharides derived from yeast such as yeast glucan and yeast mannan, from other bacteria, from lichens and from basidiomycetes. Among them, commercial products currently available on the market as anticancer immunopotentiators include Krestin derived from the cultured mycelia of kawaratake (*Coriolus*

versicolor, Basidiomycetes: Polyporaceae) (booster of
immune function of hosts, Kureha Chemical Industry and
Sankyo Co.Ltd.), a polysaccharide derived from shiitake
(*Lentinus edodes*) called lentinan and a polysaccharide
5 derived from suehirotake (*Schizophyllum Commune*).

Lentinus edodes (Shiitake) is a common edible
mushroom found in Japan and China, and has been cultivated
in Japan for about 300 years. It has been recently
elucidated for its pharmacological effects and effective
10 ingredients and reported to have various effects, such as
the growth inhibition effects on transplanted tumor cells
in the large bowel and liver in rats and mice (Sugano N. et
al., *Cancer Letter*, 27:1, 1985; Suzuki Y. et al., *Journal*
of the Japan Society of Coloproctology, 43:178, 1990);
15 mitogenic effect (Tabata T. et al., *Immunopharmacology*,
24:57, 1992; Hibino et al., *Immunopharmacology*, 28:77,
1994), etc.

The present inventors researched the LAK activity-
enhancing effect (antitumor and/or anticancer activity) of
20 *Lentinus edodes* with a view to providing materials and
methods for screening the LAK activity-enhancing effect in
vivo demonstrated by direct administration of an extract of
Lentinus edodes mycelium.

In a conventional method, the LAK activity-enhancing
25 effect was tested by actually administering an LAK activity
enhancer to the host or reinfusing into the host the
activated lymphocytes which are prepared by isolating a
large amount of autologous lymphocytes followed by

activating them in vitro with an LAK activity enhancer. This method involves a number of problems such as the physical stress imposed on the subject, the high cost of the therapy. Therefore, the establishment of an in vitro
5 screening method to confirm whether or not an LAK activity enhancer actually has an effect in vivo may make it possible to reduce physical stress and the high cost.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

10 The inventors of the present invention found that an extract of the mycelium, which is a precursor to the edible fruiting body of *Lentinus edodes*, has a far higher immunopotentiating activity, antitumor activity and/or anticancer activity than the fruiting body. We also found
15 that said extract can be used as an alternative to IL-2 to induce a LAK activity in vitro. We accomplished the present invention on the basis of the finding that the antitumor effect in vivo and/or anticancer effect, especially LAK activity-enhancing effect shown by direct in
20 vivo administration of said extract can be screened in vitro.

More specifically, the present inventors found that the in vivo cytotoxicity, which is exerted by the direct administration of an antitumor or anticancer agent,
25 especially an LAK activity enhancer containing *Lentinus edodes* mycelium extract, has a positive correlation with the cytotoxicity which is exerted when lymphocytes prepared from a subject are activated with said LAK activity

enhancer. The present invention provides a method for determining in vitro a material having an LAK activity-enhancing effect suitable for a subject, comprising the steps of:

5 (a) isolating peripheral blood from the subject to prepare lymphocyte fractions,

(b) preparing an LAK-induced sample, which is produced by treating said lymphocyte fractions with a screening material of the present invention, and a control
10 sample, which is produced in the absence of the screening material, and

(c) measuring and comparing the LAK activities of said induced sample and said control sample to determine the in vitro LAK activity-enhancing effect of the screening
15 material for said subject. The present invention also provides a screening material containing the extract of *Lentinus edodes* mycelium which can be used in said in vitro screening method to screen whether or not the in vivo LAK activity can be enhanced. Therefore, the present invention
20 relates to screening materials containing the extract of *Lentinus edodes* mycelium and screening methods using said materials capable of determining in vitro before administration of the LAK activity enhancer whether or not the in vivo LAK activity-enhancing effect can be expected
25 from an LAK activity enhancer. Screening materials and screening methods of the present invention can be applied to humans as well as to domestic animals.

As used herein, "LAK activity" means the anti-tumor

cytotoxic activity of cytotoxic T-lymphocytes, which attack tumors unrecognizable by lymphocytes having NK activity, but which have little influence on autologous normal cells. "LAK activity-enhancing" refers to the effect of enhancing this LAK activity, that is inducing the production of LAK cells from lymphocytes or further enhancing the antitumor activity of existing LAK cells.

Enhancement of LAK activity increases antitumor activity of LAK cells, which leads to an improvement in the function of the cell-mediated immune system. Thus, the present invention can be applied not only to treatments for improving antitumor activity but also to treatments for improving the immune function.

15 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

FIG. 1 is a bar graph corresponding to the data of Table 1 showing the results of screening for LAK activity enhancement with the extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention.

20

THE MOST PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

The present invention provides screening materials containing an extract of *Lentinus edodes* mycelium and screening methods using said materials capable of in vitro determining before administration of said extract whether or not an LAK activity-enhancing effect can be expected by direct in vivo administration of an antitumor agent or an anticancer agent, especially an LAK activity-enhancing

formulation containing the extract of *Lentinus edodes* mycelium. As used herein, "screening materials" refers to materials used for testing in vitro the LAC activity-enhancing effect obtained by in vivo administration. "An
5 extract of *Lentinus edodes* mycelium" used as a screening material in the present invention refers to an extract prepared by crushing and decomposing mycelia grown from *Lentinus edodes* cultured on a solid medium or a solid medium itself containing said mycelia in the presence of
10 water and an enzyme.

The extract of *Lentinus edodes* mycelium as used herein is preferably obtained by, but not limited to, the following process. *Lentinus edodes* spawn is inoculated on a solid medium based on bagasse (sugar cane residue) and
15 defatted rice bran to grow mycelia, and then the solid medium containing the grown mycelia is delignified to enable about 30% by weight or less to pass through a 12-mesh sieve. To this delignified solid medium are added water and one or more enzymes consisting of a carbohydrase,
20 protease or combination thereof, and said solid medium is maintained at a temperature of around 30-55°C to crush and grind. The enzymes used in this step include, but not limited to, cellulase, protease or glucosidase. The solid medium crushed and ground in said step is adapted so that
25 at least 70% by weight of bagasse fiber is able to pass through a 12-mesh sieve, and then the solid medium is heated to a temperature of 95°C to ensure inactivation of the enzyme and sterilization. Finally, the resulting

suspension is filtered to give an extract of *Lentinus edodes* mycelium.

The extract of *Lentinus edodes* mycelium may be directly used in screening materials or immunotherapeutic agents of the present invention, but conveniently can be concentrated and freeze-dried into a powder to be stored and used in various forms. The freeze-dried product is a brown powder with hygroscopic characteristics and has a peculiar taste and odor.

The extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention can be directly added to lymphocyte fractions prepared from peripheral blood. When the extract of *Lentinus edodes* mycelium is directly added to lymphocyte fractions, they are contained in screening materials of the present invention preferably at a concentration of 1 ng/ml - 100 mg/ml, more preferably 1 µg/ml - 100 µg/ml, most preferably 10 µg/ml - 50 µg/ml. The extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention is preferably sterilized with acetone before it is added to cultured cells or directly added to peripheral blood.

Screening methods using screening materials of the present invention can be performed according to the method of Takagi et al. (Clinical Immunology, 19:245-249, 1987) with exception that a screening material such as the extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention is used in place of IL-2.

Accordingly, LAK activity enhancement-screening methods of the present invention are methods for

determining in vitro a material having an LAK activity-enhancing effect suitable for a subject, comprising the steps of:

(a) isolating peripheral blood from the subject to
5 prepare lymphocyte fractions,

(b) preparing an LAK-induced sample, which is produced by treating said lymphocyte fractions with a screening material of the present invention, and a control sample, which is produced in the absence of the screening
10 material, and

(c) measuring and comparing the LAK activities of said induced sample and said control sample to determine the in vitro LAK activity-enhancing effect of the screening material for said subject.

15 To induce LAK cells, lymphocytes are isolated from peripheral blood of the subject. Heparin is added to peripheral blood from the subject, and monocytes at the interface are separated by density gradient centrifugation on Ficoll-Conray solution (s.g. = 1.077). The separated
20 monocytes are washed with PBS (pH 7.4, without Ca and Mg) 2-3 times and then suspended in a culture medium (preferably, RPMI 1640 medium (Gibco) containing FBS (inactivated fetal bovine serum) and/or antibiotics, if desired) at a density of 1×10^6 cells /ml. This
25 suspension is transferred to a Petri dish which has been precoated with autoserum (plasma) at 37°C for 15 minutes, and incubated at 37°C for 1 hour. Unattached cells are recovered as lymphocyte fractions.

LAK-induced samples are, for example, prepared by the following procedure. Lymphocyte fractions prepared by the procedure above are suspended in a culture medium at a final concentration of 1×10^5 - 1×10^6 cells/ml and 100
5 μ l of the medium containing suspended cells is added to each well at a density of 1×10^4 to 1×10^5 cells/well. The number of cells per well can be appropriately determined by those skilled in the art on the basis of the activity of effector cells used, and the sensitivity of
10 target cells to effector cells, etc. Said suspending solution contains the extract of *Lentinus edodes* mycelium as a screening material at a final concentration in a range of 1 ng/ml - 100 mg/ml in accordance with the experimental design.

15 Thus, lymphocytes of the subject are cultured in the presence of the extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention at various concentrations (including zero) to prepare effector cells. As used herein, the term effector cells refer to cells treated under the culture
20 condition for 3 days and include both lymphocytes cocultured with an LAK activity enhancer (lymphocytes treated with an LAK activity enhancer) and lymphocytes cultured in the medium alone without LAK activity enhancer (lymphocytes treated under the extract-free condition).

25 Control samples are prepared by the same procedure as for LAK-induced samples with exception that sterilized recombinant IL-2 (rIL-2; 2000 U/ml) is added in place of the screening material.

LAK activity can be determined by ^{51}Cr release assay, [^3H] uridine assay or the like. In terms of convenience and objectivity, the ^{51}Cr release assay is preferably used in the present invention. The ^{51}Cr release assay is one of
5 methods for determining in vitro the cytotoxicity against target cells of LAK cells induced from lymphocytes treated with an LAK activity enhancer. The ^{51}Cr release assay is a method for determining the cytotoxicity of effector cells against target cells, which comprises the steps of:

10 (i) adding ^{51}Cr -labeled sodium chromate to the target cells to label the target cells,

(ii) reacting the target cells with effector cells (such as killer T cells or LAK cells) stimulated with a screening material or rIL-2 as a control, and

15 (iii) measuring the amount of ^{51}Cr released into the cell culture supernatant from the target cells bursted by the effector cells.

Subcultured cells used as target cells in the ^{51}Cr release assay are preferably Daudi cells or Raji cells.
20 Target cells cultured in a culture flask are recovered, labeled with ^{51}Cr and then divided into each well of a microtiter plate after labeling. It is preferable to use a culture media suitable for the growth of the cells as a culture media for the target cells. The liquid media
25 include, for example, RPMI 1640 appropriately supplemented with serum, antibiotics, etc.

Target cells are labeled by adding 100-150 μCi ^{51}Cr -sodium chromate per 10^6 cultured target cells followed by

stirring thoroughly and incubating at 37°C for 1-2 hours. Cultured cells are washed with PBS three times, and then suspended in RPMI 1640 medium containing 10% FBS at 1×10^6 cells/ml. The labeled cells are washed with the medium which is used for culture or phosphate buffer (PBS), and adjusted to a final concentration of 1×10^6 cells/ml in the medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) or fetal calf serum (FCS) for assay. Target cells at a density of 5×10^4 cells/well are added to each well of a microtiter plate in an amount of 50 μ l.

In the assay for determining cytotoxicity, each well containing said target cells is further supplied with 100 μ l of 1N HCl for maximum dissociation, 100 μ l of the medium alone for natural dissociation, or effector cells in 100 μ l of the medium at a density of 1×10^5 - 1×10^6 cells/ml stimulated with the extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention at various concentrations or 2000 U/ml rIL-2 as a control for experimental dissociation. Then, the microtiter plate is centrifuged at 800 rpm for 5 minutes on a plate centrifuge to collect cells at the bottom of the well, and then incubated in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 3.5 hours.

Cytotoxicity to target cells in the ⁵¹Cr release assay is calculated by the equation below.

25

$$\text{LAK activity\%} = \frac{\text{Experimental dissociation(cpm)} - \text{Natural dissociation(cpm)}}{\text{Maximum dissociation(cpm)} - \text{Natural dissociation(cpm)}} \times 100$$

In vitro LAK activity-inducing ability of the

screening material can be determined by comparing the LAK activities of the induced sample and control sample calculated by the equation above.

At the step of determining maximum dissociation,
5 natural dissociation and experimental dissociation, target cells are incubated under 5% CO₂ at 37°C. Those skilled in the art may appropriately determine a culture period in accordance with the purpose of the experiment, the number of cells used or other conditions; for example, 3.5 hours
10 in the present invention.

The radioactivity of ⁵¹Cr released in the culture supernatant can be measured using a scintillation counter or the like.

In a preferred embodiment of the present invention,
15 various steps are performed as follows, though it will be appreciated by those skilled in the art that suitable changes and modifications can be made.

The culture supernatant in each well is collected from the incubated plate to measure radioactivity in a
20 scintillation counter.

The extract of *Lentinus edodes* mycelium which exhibited an in vitro LAK-inducing activity in the above screening method was administered at 3600 mg/day for 7 days to induce LAK activity in vivo. Lymphocyte fractions
25 collected by the above lymphocyte recovery method were used to determine LAK activity % under the same conditions as for said LAK-induced samples, showing that the in vivo LAK activity-enhancing effect has a positive correlation with

the in vitro result.

The following examples further illustrate the present invention but should not be taken as limiting the scope of the invention thereto. It will be appreciated by those skilled in the art that various changes and modifications can be made without departing from the spirit of the present invention.

EXAMPLES

10 Example 1: Preparation of an extract of *Lentinus edodes* mycelium

A solid medium consisting of 90 parts by weight of bagasse and 10 parts by weight of rice bran was soaked with an appropriate amount of pure water, and then inoculated with *Lentinus edodes* spawn and allowed to stand in an incubator at controlled temperature and humidity to grow mycelia. After mycelia spread over the solid medium, the bagasse base was delignified to enable 24% by weight or less to pass through a 12-mesh sieve. To 1.0 kg of this delignified medium were added 3.5 L of pure water and 2.0 g of purified cellulase while maintaining the solid medium at 40°C to prepare a medium-containing mixture.

Then, the medium-containing mixture was circulated by a variable speed gear pump, during which the solid medium was crushed and ground at the gears for about 200 minutes so that about 80% by weight of bagasse fiber is able to pass through a 12-mesh sieve. The medium-containing mixture was crushed and ground while the temperature of

said mixture was gradually increased. Then, the medium-
containing mixture was further heated to 90°C to ensure
deactivation of the enzyme and sterilization and allowed to
stand at 90°C for 30 minutes. The resulting medium-
5 containing mixture was filtered through a 60-mesh filter
cloth to give an extract solution of Lentinus edodes
mycelium, which was concentrated and then converted into a
freeze-dried powder.

The extract of Lentinus edodes mycelium as prepared
10 above contained 25.3% (w/w) carbohydrates determined by the
phenol-sulfuric acid method, 19.7% (w/w) proteins
determined by the Lowry method and 2.6% (w/w) polyphenols
determined by the Folin-Denis method using gallic acid as
standard. The extract of Lentinus edodes mycelium further
15 contains 8% crude fat, 22% crude ash and about 20% soluble
nitrogen-free materials other than carbohydrates.

The extract of Lentinus edodes mycelium had a sugar
composition (%) as follows: Xyl 15.2, Ara 8.2, Man 8.4, Gul
39.4, Gal 5.4, GlcN 12.0, GluUA 11.3.

20

Example 2: Determination of LAK activity

Initially, peripheral blood was collected from
subjects A, B and C before administration of the extract of
Lentinus edodes mycelium and after oral administration of
25 1200 mg the extract of Lentinus edodes mycelium three times
daily for one week to each subject. Lymphocyte fractions
isolated from these peripheral bloods by the method below
can be screened for the correlation between the in vivo

lymphocyte-activating ability of the extract of the present invention and the in vitro lymphocyte-activating ability of the extract.

Heparin was first added to the peripheral bloods, and
5 monocytes at the interface were separated by density
gradient centrifugation on Ficoll-Conray solution (s.g. =
1.077), then the separated monocytes were washed with PBS
(pH 7.4, without Ca and Mg) twice and then suspended in
RPMI 1640 medium (Gibco) containing 10% FBS (inactivated
10 fetal bovine serum) at a density of 1×10^6 cells /ml. The
cells isolated by the method above were transferred to a
culture dish which had been precoated with autoserum
(plasma) at 37°C for 15 minutes followed by incubation at
37°C for 1 hour, and then unattached cells were recovered
15 as lymphocyte fractions.

Target cells (Daudi cells) subcultured in RPMI 1640
medium containing 10% FBS were recovered by centrifugation,
and incubated with 100-150 $\mu\text{Ci}/10^6$ cells of ^{51}Cr -sodium
chromate (New England Nuclear) in a 5% CO_2 incubator at
20 37°C for 1 hour. Cultured cells labeled with ^{51}Cr were
washed with PBS three times, and then suspended in RPMI
1640 medium containing 10% FBS at 1×10^6 cells/ml.

A 50 μl aliquot (5×10^4 cells/well) of target cells
labeled as above was added to each well of a microtiter
25 plate, and 100 μl of 1N HCl was further added to each well
of the maximum dissociation group (positive control), 100
 μl of RPMI 1640 medium containing 10% FBS was further added
to each well of the natural dissociation group (negative

control), and effector cells stimulated with 10 µg/ml of the extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention or 2000 U/ml of rIL-2 as a control were further added to each well of the experimental dissociation group
 5 (each 100 µl (1 x 10⁴ cells/well)). The plate was centrifuged at 800 rpm for 5 minutes on a plate centrifuge to collect cells at the bottom of the well, and then incubated in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 3.5 hours.

The culture supernatant in each well was collected by
 10 SOKEN-PET Σ-96 from the incubated plate, and the radioactivity was measured in a γ-scintillation counter.

LAK activity was calculated by the equation below.

15
$$\text{LAK activity\%} = \frac{\text{Experimental dissociation(cpm)} - \text{Natural dissociation(cpm)}}{\text{Maximum dissociation(cpm)} - \text{Natural dissociation(cpm)}} \times 100$$

The results are shown in Table 1 and Fig. 1.

Table 1:

20	Test No.		LAK activity		
			Subject		
			A	B	C
	1	Before administration	13%	27%	14%
	2	Screening using extract (final concentration: 10 µg/ml)	21%	34%	15%
25	3	After administration of extract	40%	43%	15%

INDUSTRIAL APPLICABILITY

The extract of *Lentinus edodes* mycelium was orally administered to subjects A and B to exhibit an enhancement

of LAK activity in vivo(see Table 1, Test No. 3). The in vitro screening with the extract of the present invention exhibited an LAK activity-enhancing effect when lymphocytes isolated from peripheral blood of subjects A and B were
5 stimulated with the extract of the present invention and said effect had a positive correlation with the LAK activity-enhancing effect obtained by directly orally administering the extract of the present invention to subjects A and B (see Table 1, Test No. 2). Thus, it was
10 found that the LAK activity-enhancing effect of the extract of Lentinus edodes mycelium of the present invention obtained by oral administration can be predicted by in vitro screening.

The extract of Lentinus edodes mycelium was actually
15 orally administered to subject C to exhibit unenhancement of LAK activity even in vivo (see Table 1, Test No. 3). The in vitro screening with the extract of the present invention showed no LAK activity-enhancing effect even when lymphocytes collected from peripheral blood of subject C
20 were stimulated with the extract of the present invention (see Table 1, Test No. 2). This example also demonstrated that the LAK activity-enhancing effect of the extract of Lentinus edodes mycelium of the present invention obtained by oral administration can be predicted by in vitro
25 screening.

Therefore, it was found that the LAK activity-enhancing effect of LAK activity enhancers of the present invention obtained by oral administration can be exactly

predicted from in vitro screening results. Thus, the in vivo LAK activity-enhancing effect of the direct administration of LAK activity enhancers containing the extract of *Lentinus edodes* mycelium of the present invention can be conveniently determined in vitro before said LAK activity enhancers are actually directly administered. As a result, LAK activity enhancers can be effectively and rapidly administered to subjects promising for LAK activity-enhancing effect and, moreover, useless administration of said LAK activity enhancers to subjects unpromising for LAK activity-enhancing effect can be prevented.

Moreover, physical stress on the subject is greatly lessened in methods of the present invention because the in vivo therapeutic effect of LAK activity enhancers can be screened in vitro without the need to collecting a large number of lymphocytes from the blood of the subject.

CLAIMS

1. A method for determining a material in vitro having an LAK activity-enhancing effect suitable for a subject, comprising the steps of:

(a) isolating peripheral blood from the subject to prepare lymphocyte fractions,

(b) preparing an LAK-induced sample, which is produced by treating said lymphocyte fractions with a screening material of the present invention, and a control sample, which is produced in the absence of the screening material, and

(c) measuring and comparing the LAK activity of said induced sample and said control sample to determine the in vitro LAK activity-enhancing effect of the screening material for said subject.

2. The method of claim 1 wherein the screening material is an extract of *Lentinus edodes* mycelium.

3. A screening material containing an extract of *Lentinus edodes* mycelium capable of being used in the in vitro screening method of claim 1 to screen if the LAK activity can be enhanced in vivo.

4. A method for treating a tumor of a subject by in vivo administering the screening material of claim 2.

ABSTRACT

It is an object of the present invention to provide inexpensive materials and methods for screening immunotherapeutic agents exhibiting antitumor and/or anticancer activity.

The present invention provides a method for determining in vitro a material having an LAK activity-enhancing effect suitable for a subject, comprising the steps of:

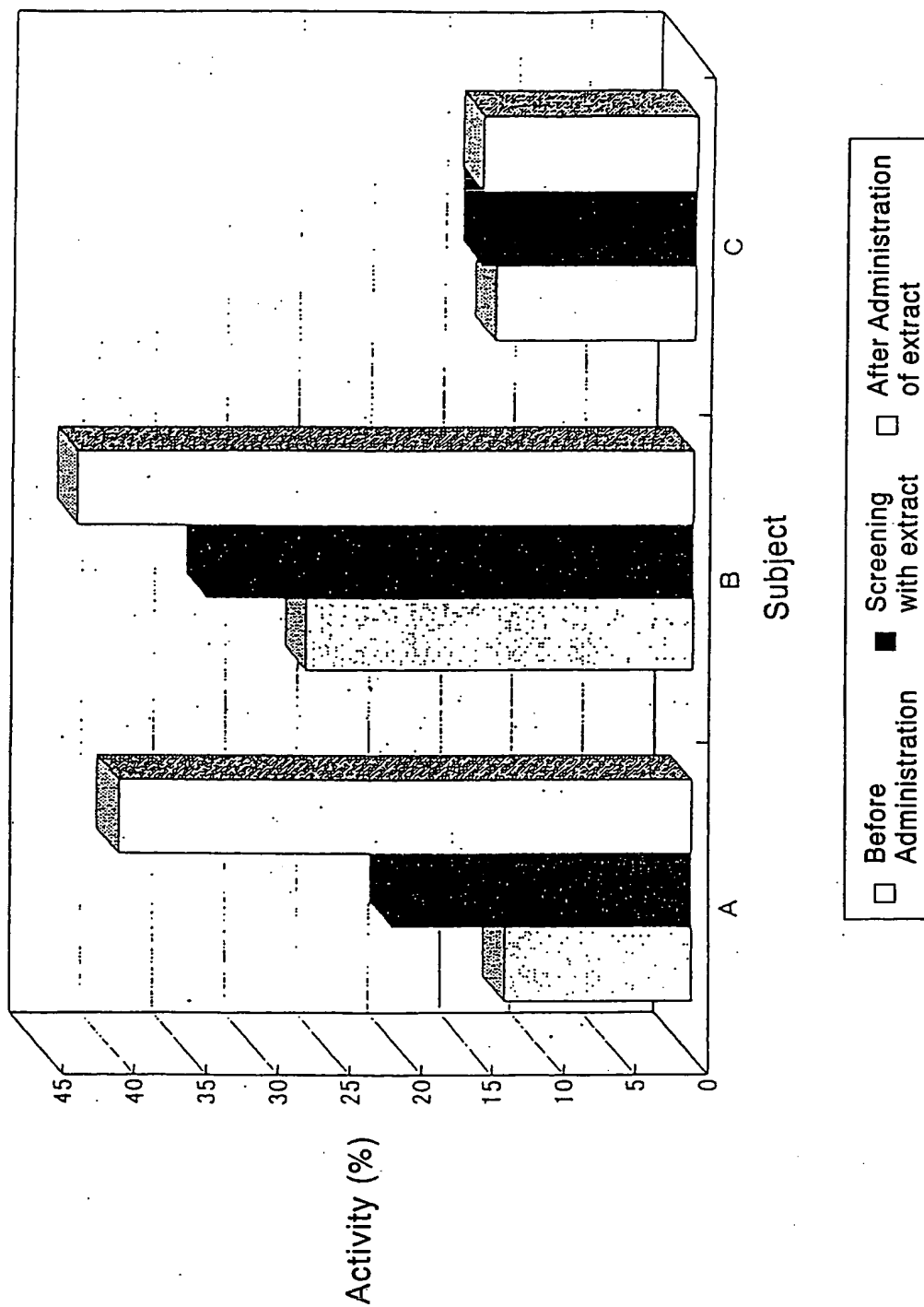
(a) collecting peripheral blood from the subject to prepare lymphocyte fractions,

(b) preparing an LAK-induced sample and a control sample by adding or not a screening material of the present invention to said lymphocyte fractions, and

(c) measuring the LAK activities of said induced sample and said control sample and comparing the results to determine the in vitro LAK activity-enhancing effect of the screening material for said subject.



Fig. 1



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 G01N 33/15, 33/50	A1	(11) 国際公開番号 WO00/33069 (43) 国際公開日 2000年6月8日(08.06.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06615</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月26日(26.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/353926 1998年11月27日(27.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小林製薬株式会社 (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-8507 大阪府大阪市中央区道修町4-3-6 Osaka, (JP) 長岡 均(NAGAOKA, Hitoshi)(JP/JP) 〒270-1152 千葉県我孫子市寿2丁目22番13号 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 浅野健治(ASANO, Kenji)(JP/JP) 松田由紀子(MATSUDA, Yukiko)(JP/JP) 〒532-0035 大阪府大阪市淀川区三津屋南3-13-35 小林製薬株式会社内 Osaka, (JP) 田島 裕(TAJIMA, Yutaka)(JP/JP) 〒849-0935 佐賀県佐賀市八戸溝3丁目10番511号 Saga, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, GB, KR, SG, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: SUBSTANCE CONTAINING SHIITAKE MUSHROOM HYPHA EXTRACT FOR SCREENING LAK ACTIVITY AND METHOD FOR SCREENING LAK ACTIVITY BY USING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 シイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性スクリーニング物質およびそれを用いたLAK活性スクリーニング法</p> <p>(57) Abstract An inexpensively available substance for screening an immunotherapeutic agent having antitumor and/or anticancer activities. A screening method for determining <i>in vitro</i> a substance having a LAK activity potentiating effect suitable for a subject which involves the following steps: (a) collecting the peripheral blood of the subject and preparing a lymphocyte fraction therefrom; (b) preparing a LAK-induction sample by adding the above screening substance to the lymphocyte fraction and a control sample containing no screening substance; and (c) measuring the LAK activities of the induction sample and the control sample and comparing the activities to thereby determine the LAK activity potentiating effect of the screening substance <i>in vitro</i> on the subject.</p>		

(57)要約

本発明は、安価に入手可能な抗腫瘍および／または抗癌活性を有する免疫療法剤をスクリーニングするための物質およびその方法を提供することを目的とする。

本発明は、以下の工程：

- (a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；
 - (b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；
 - (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の in vitro での LAK 活性増強作用を決定すること；
- を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を in vitro で決定するスクリーニング方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LC	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TH	タイ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明細書

シイタケ菌糸体抽出物を含有する LAK 活性スクリーニング物質
およびそれを用いた LAK 活性スクリーニング法5 技術分野

本発明は、腫瘍免疫学の分野に関する。特定すれば、本発明は、抗腫瘍および／または抗癌活性を有する免疫療法剤をスクリーニングするための物質およびその方法に関する。さらに特定すれば、本発明は、in vitro において in vivo における LAK 細胞（Lymphokine Activated Killer Cell：リンホカイン活性化キラー細胞）の活性増強効果が得られるかどうかを判断するためのスクリーニング物質およびその方法に関する。

背景技術

腫瘍免疫学における基本的概念として、腫瘍細胞が腫瘍抗原を有することが知られている。腫瘍細胞が有する腫瘍抗原には、正常細胞には発現せず腫瘍細胞にのみ存在する腫瘍特異抗原（TSA：Tumor Specific Antigen）、または正常細胞にもごく微量存在するが細胞の癌化に伴いその発現が増強される腫瘍関連抗原（TAA：Tumor Associated Antigen）が存在する。このような腫瘍抗原は、正常細胞の癌化に伴い生じる遺伝子変異に伴って新たに発現されるか、または当該変異に伴って発現調節が変化することにより発現される。異常な抗原性を有する腫瘍細胞の治療法としては、免疫療法がもっとも一般的であり、その例としては、被検体を腫瘍抗原で免疫したり、被検体の免疫機能を増強する薬剤が用いられる。一般に、腫瘍細胞を破壊する活性は、免疫系細胞の中でも NK（ナチュラルキラー）細胞で高く、また NK 細胞の活性も免疫療法により増強されることが知られている。

25 NK 細胞は、正常個体中に存在する非 T 非 B 細胞障害性リンパ系細胞であり、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞等に対して MHC 抗原に拘束されずに、MHC クラス I 分子を発現しないかまたは発現が低下した細胞に対する障害活性を示すことが知られている。しかしながら現在では、NK 細胞でも殺傷し得ない腫瘍細胞の存在も明らかとなった。

米国国立ガン研究所 (NCI : National Cancer Institute) の S. Rosenberg は、末梢リンパ球をインターロイキン 2 (IL-2) と共に培養すると、自家ガンを含む広い範囲の標的ガン細胞に対して細胞障害性を示す細胞を誘導することができ、この細胞によれば NK 細胞では殺傷不可能なガン細胞をも殺傷することができることを発見した (特開昭 62-116518 号参照)。このキラー細胞はリンホカイン活性化キラー細胞 (LAK 細胞 : Lymphokine Activated Killer Cell) と命名された。LAK 細胞は、細胞学上は均一な集団ではなく、NK 細胞系やキラーT 細胞系の細胞集団であることが知られている。近年は、被検体由来の末梢リンパ球を細胞培養系中で IL-2 を用いて活性化した後、抗腫瘍活性を示す LAK 細胞を再び被検体体内に移入する、養子免疫の方法が試みられている (LAK 療法)。このような LAK 細胞の繰り返し投与による養子免疫により、末期癌の縮小あるいは増殖抑制例が報告されている。しかしながら、LAK 療法の効果は個体差があり、ほとんど効果を享受できない場合もある。また、被検体から多量の白血球を分離することが被検体に肉体的負担を負わせること、そして分離した白血球細胞を大量培養する必要がある経済的な負担が大きいことなど、種々の問題点がある。さらに、IL-2 を直接投与することによって LAK 療法を行う場合、高濃度の IL-2 投与による重篤な副作用が生じる。

具体的には、IL-2 を用いた LAK 養子免疫療法を行う場合、全身倦怠、悪寒、発熱、低アルブミン、貧血、好酸球増加などの症状を副作用として生じ、これらの副作用は IL-2 を単独で用いた場合よりも強いことが知られている。さらに注目すべきは、重大ないくつかの副作用の発現について、LAK 細胞が正常細胞に対して傷害活性を有している可能性が原因として考えられている。このような LAK 細胞による造血幹細胞傷害により、貧血や血小板減少が生じるほか、リンパ球、マクロファージや血管内皮細胞に対する *in vitro* 傷害も生じることも報告されている。また、IL-2 は経口投与による吸収が悪く、現在のところ、直接投与に際しては注射投与が主流である。

したがって、効果が明らかでない状態で副作用を生じる可能性のある LAK 療法を行うのではなく、直接投与によって LAK 活性を増強させ得るかどうかについてあらかじめ *in vitro* 系においてスクリーニングすることが望まれていた。しかし

ながら、IL-2 を用いて in vitro で行うスクリーニングでは、費用がかかりすぎるといふ欠点がある。

従来から、細菌類あるいは食品等が抗癌作用を有することが知られている。これらの抗癌作用を有する細菌類あるいは食品等は副作用が少なく安全であることから、これらの細菌類あるいは食品等からの抗癌作用物質の探索が試みられてきた。これまでに細菌類により癌を制圧しようとする多くの試みが行われており、例えばセラチア菌と溶連菌の培養濾液を用いた Coley's トキシン (1964)、BCG による白血病治療 (Mathe, G., Adv. Cancer Res., 14, 1, 1971) およびモルモットにおける癌腫瘍の退縮 (Zbar, B., et al., J. Natl. Cancer Inst., 48, 831, 1971)、
10 および酵母壁多糖体の投与によるサルコーマ 180 等の移植癌に対する有効性等が報告されている。

特に、多糖体に関しては、酵母グルカン、酵母マンナン、その他の菌体の多糖体、地衣類および担子菌類の多糖体における抗癌効果について多くの研究が行われてきた。これらのうちで抗癌免疫増強薬として現在市販されているものとして
15 は、担子菌類のサルノコシカケ科のカワラタケ培養菌糸体由来のクレスチン (呉羽化学、三共製薬：宿主の免疫機能賦活剤) およびシイタケ多糖体のレンチナン並びにスエヒロタケ多糖体などがある。

また、シイタケ (*Lentinus edodes*) は日本並びに中国を代表する食用キノコであって日本では約 300 年も前から人工栽培が行われてきたが、その薬理効果並び
20 に薬効成分が最近解明されつつあり、例えば、ラット・マウスにおける大腸および肝臓等の移植腫瘍細胞の増殖抑制効果 (Sugano, N, et al., Cancer Letter, 27: 1, 1985 ; 鈴木康将ら、日本大腸肛門病会誌、43: 178, 1990) およびマイトジェン効果 (Tabata, T. et al., Immunopharmacology, 24: 57, 1992 ; Hibino, et al., Immunopharmacology, 28: 77, 1994) などが報告されている。

25 本発明者らは、シイタケの持つ LAK 活性増強効果 (抗腫瘍および／または抗癌活性) に着目し、シイタケ菌糸体抽出物を直接生体内に投与した際の in vivo で
の LAK 活性増強効果を、in vitro でスクリーニングするための、スクリーニング物質およびその方法を提供することを課題とする。

従来の方法では、実際に生体内に LAK 活性増強物質を投与することにより、あ

るいは生体内のリンパ球を大量に調製し、それを *in vitro* にて LAK 活性増強物質により活性化し、その後実際に生体内に活性化したリンパ球を戻すことにより、LAK 活性増強効果があるかどうかを確認していた。この方法では治療に費用がかかりすぎるという欠点の他に、被検体の肉体的負担が課題となるという欠点が存在していた。したがって、LAK 活性増強物質が実際に生体内で効果を有するかどうかについて *in vitro* で簡便にスクリーニングすることができれば、被検体の肉体的、金銭的負担を大きく軽減することができる。

発明の開示

10 本発明者らは、シイタケの生活環において食用形態である子実体の前の形態である菌糸から抽出された成分中に、子実体をはるかに凌ぐ免疫賦活活性並びに抗腫瘍活性および／または抗癌活性があることを見いだした。しかも当該抽出物を IL-2 の代替物として *in vitro* における LAK 活性誘導物質として使用することにより、当該抽出物を直接生体内に投与した際の *in vivo* における抗腫瘍作用および／または抗癌作用、特に LAK 活性増強作用を、*in vitro* においてスクリーニングできることを見いだして、本発明を完成するに至った。

より具体的には、本発明者らは、シイタケ菌糸体抽出物を含む抗腫瘍物質もしくは抗癌物質、特に LAK 活性増強物質を直接生体内に投与する場合の *in vivo* における細胞傷害活性が、被検体から調製したリンパ球を *in vitro* において前記の
20 LAK 活性増強物質により活性化する場合の細胞傷害活性と正の相関を有することを見出した。本発明は、以下の工程：

- (a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；
 - (b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；
 - 25 (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の *in vitro* での LAK 活性増強作用を決定すること；
- を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を *in vitro* で決定する方法を提供する。本発明はまた、前述の *in vitro* におけるスクリーニング方法に使

用することにより、in vivo において LAK 活性を増強し得るかどうかをスクリーニングし得る、シイタケ菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質を提供する。したがって、本発明は LAK 活性増強物質により in vivo での LAK 活性増強効果を期待できるか否かについて、LAK 活性増強物質の投与前に in vitro において判断

5 することができる、シイタケの菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質およびそのスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング物質およびスクリーニング方法は、ヒトのみならず家畜にも使用可能である。

本明細書において、「LAK 活性」とは、NK 活性を担うリンパ球では認識できない腫瘍を攻撃でき、かつ自己の正常細胞にはほとんど影響を与えない細胞障害性 T

10 リンパ球の示す抗腫瘍活性のことを意味する。「LAK 活性増強」とはこうした LAK 活性を強めることであり、リンパ球から LAK 細胞を誘導するあるいは既に存在する LAK 細胞の抗腫瘍活性をさらに高めることを意味する。

LAK 活性を増強することで、LAK 細胞の抗腫瘍活性を高めることができるが、これは細胞性免疫系の向上を導く。したがって、抗腫瘍活性の向上を期待す

15 る治療以外にも、免疫系の向上を目的とする治療に用いることができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を用いた LAK 活性増強スクリーニングの結果を示す表 1 のデータを、棒グラフにより示したものである。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明は、シイタケ菌糸体抽出物を含む抗腫瘍剤もしくは抗癌剤、特に LAK 活性を増強するための製剤を、直接生体内に投与することにより LAK 活性の増強効果を期待できるか否かについて、製剤投与前に in vitro において判断することが

25 できる、シイタケの菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質およびそのスクリーニング方法を提供する。本発明において、「スクリーニング物質」とは、それを生体に投与した場合の in vivo での LAK 活性の増強効果を、in vitro にて調べるために使用する物質のことをいう。本発明において、スクリーニング物質として用いられる「シイタケ菌体抽出物」とは、シイタケ菌を固体培地上で培養した

際に得られる菌糸体もしくは菌糸体を含む固体培地を、水および酵素の存在下で粉砕、分解して得られる抽出物と言う。

シイタケ菌糸体抽出物は、好ましくは以下の方法により得られたものを使用するが、これに限定されない。即ち、バガス（サトウキビのしぼりかす）と脱脂米糠を基材とする固体培地上にシイタケ菌を接種し、菌糸体を増殖させた後、菌糸体が増殖した固体培地を 12 メッシュ通過分が 30 重量%以下となるように解束する。この解束された固体培地に水を加え、さらに炭水化物分解酵素、またはタンパク質分解酵素、もしくはこれらの組合せからなる酵素（群）を添加して、30-35℃の温度に保つことにより、前記固体培地を粉砕、擂潰する。この工程で使用する酵素としては、セルラーゼ、プロテアーゼ、グルコシダーゼなどが含まれるが、これらには限定されない。前記工程で粉砕、擂潰した固体培地を、バガス繊維の少なくとも 70 重量%以上が 12 メッシュ通過分であるように調製して、次に 95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させ、同時に滅菌する。最後に得られた懸濁状液体を濾過することによりシイタケ菌糸体抽出物を得る。

シイタケ菌糸体抽出物はそのまま本発明のスクリーニング物質あるいは免疫療法剤として用いてもよいが、これを濃縮、凍結乾燥して粉末として保存して、使用時に種々の形態で使用するのが便利である。凍結乾燥して得られる粉末は褐色粉末であり、吸湿性があり、特異な味と匂いを有する。

本発明のシイタケ菌糸体抽出物は、末梢血から得られるリンパ球画分に対して直接添加することができる。リンパ球画分に対して直接添加する場合における本発明のスクリーニング物質中に含まれるシイタケ菌糸体抽出物の濃度は、好ましくは 1 ng/ml~100 mg/ml であり、さらに好ましくは 1 μg/ml~100 μg/ml であり、特に好ましくは 10 μg/ml~50 μg/ml である。本発明のシイタケ菌糸体抽出物は、培養細胞に添加する前にまたは末梢血に対して直接添加する前に、アセトンによる無菌処理を行うことが好ましい。

本発明のスクリーニング物質を用いてスクリーニングを行う方法としては、高木らの方法に従うが（臨床免疫、19: 245-249, 1987）、IL-2 に代えて、スクリーニング物質、例えば本発明のシイタケ菌糸体抽出物を用いる点で従来の方法と相違する。

即ち、本発明の LAK 活性増強スクリーニング法は、以下の工程：

(a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；

(b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；

5 (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の *in vitro* での LAK 活性増強作用を決定すること；

を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を *in vitro* で決定する方法である。

10 LAK 細胞を誘導するために、被験者の末梢血からリンパ球を分離する。被験者から採血した末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary 液 (s. g. = 1.077) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離する。分離された単核球を PBS (pH7.4、Ca および Mg を含まず) により 2~3 回洗浄したのち、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように培養液 (好ましくは、RPMI 1640 培地 (Gibco) に、FBS (非働化血清) 15 や抗生物質などを適宜加えたもの) に懸濁する。これを、自己血清 (血漿) を 37℃ 15 分処理してコートしたペトリ皿に移し、37℃ 1 時間培養する。非付着性細胞を回収して、リンパ球分画とする。

LAK 誘導サンプルは、例えば以下の方法により調製する。すなわち、上述の方法により得られたリンパ球画分を、細胞の最終濃度が $1 \times 10^5 / \text{ml} \sim 1 \times 10^6 / \text{ml}$ となるように調製し、培養液中に浮遊させ、1 ウェルあたり細胞を懸濁した培養液 20 $100 \mu\text{l}$ を添加することにより、細胞数が $1 \times 10^4 / \text{ウェル} \sim 1 \times 10^5 / \text{ウェル}$ となるようにする。1 ウェル当たりの細胞数は、当業者が、使用するエフェクター細胞の活性、標的細胞のエフェクター細胞に対する感受性などにより適宜定めることができる。該浮遊液には、実験計画に従って、スクリーニング物質として最終濃度 25 $1 \text{ ng/ml} \sim 100 \text{ mg/ml}$ の範囲のシイタケ菌糸体抽出物を加える。

このようにして、被検体のリンパ球を種々の濃度 (濃度ゼロを含む) の本発明のシイタケ菌糸体抽出物の存在下で培養しエフェクター細胞とする。本明細書においては、エフェクター細胞とは、3 日間上記の培養処理を行った細胞を指し、LAK 活性増強物質と共に培養されたリンパ球 (LAK 活性増強物質添加処理されたり

ンパ球)および LAK 活性増強物質を含まない培養液のみで培養されたリンパ球(無添加誘導処理されたリンパ球)の両方を含む。

対照サンプルは、スクリーニング物質を添加する代わりに滅菌した組換え IL-2 (rIL-2 ; 2000 U/ml) を添加する以外は、LAK 誘導サンプルを調製する方法と同一の方法により調整する。

LAK 活性の測定は、 ^{51}Cr 放出アッセイ法、 ^3H ウリジン法などの方法により行う。本発明においては、簡便性および客観性の観点から、 ^{51}Cr 放出アッセイを使用することが好ましい。 ^{51}Cr 放出アッセイは、LAK 活性増強物質で処理されたリンパ球から誘導された LAK 細胞による標的細胞傷害活性を *in vitro* において測定する方法の一つである。 ^{51}Cr 放出アッセイは、以下の工程：

(i) 標的細胞に ^{51}Cr で標識したクロム酸ナトリウムを添加することにより標的細胞を標識すること；

(ii) 前記標的細胞を、スクリーニング物質あるいは対照としての rIL-2 により刺激したエフェクター細胞（例えば、キラー T 細胞や LAK 細胞）と反応させること；

(iii) 標的細胞がエフェクター細胞により破壊される場合に細胞培養上清中に放出される ^{51}Cr の量を測定すること；

からなる、エフェクター細胞による標的細胞に対する細胞傷害活性を測定する方法である。

^{51}Cr 放出アッセイにおいて使用する標的細胞である継代培養細胞としては、好ましくは Daudi 細胞あるいは Raji 細胞を使用する。標的細胞の培養は、培養フラスコ中で培養したものを回収し、 ^{51}Cr で標識した後マイクロタイタープレートに分注して行う。標的細胞の培養液としては、使用する細胞が増殖するために適したものを使用し、例えば RPMI 1640 などの培養液に血清、抗生物質などを適宜追加したものを使用する。

標的細胞の標識は、培養した標的細胞 10^6 個あたりに $100\sim 150\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加し、よく攪拌した後 37°C で $1\sim 2$ 時間インキュベートすることにより行う。培養細胞は、PBS により 3 回洗浄した後、 1×10^6 /ml になるように 10% FBS 添加 RPMI 1640 培地に懸濁したものを使用する。標識した後、培

養時に用いた培養液またはリン酸緩衝液（PBS）を用いて洗浄し、最後に 10% のウシ胎児血清（FBS）または仔ウシ血清（FCS）を含む培養液中で最終濃度 1×10^6 /ml となるように調製し、アッセイに使用する。標的細胞は、マイクロタイタープレート（MP）の各ウェル中に、細胞数が 5×10^4 /ml となるように、50 μ l ずつ分注する。

細胞傷害活性を測定するためのアッセイにおいては、上述の標的細胞を分注した各ウェルに、最大解離用には 1N-HCl を 100 μ l をさらに添加し、自然解離用には培養液のみ 100 μ l をさらに添加し、そして実験解離用には種々の濃度の本発明のシイタケ菌糸体抽出物または対照である 2000 U/ml の rIL-2 により刺激したエフェクター細胞 1×10^5 /ml \sim 1×10^6 /ml を含有する培養液 100 μ l をさらに添加する。次いで、マイクロタイタープレートをプレート遠心分離機により、800 rpm で 5 分間遠心処理して細胞をウェル底部に集めた後、5% CO₂ 培養器にて 37℃ において 3.5 時間培養する。

⁵¹Cr 放出アッセイにおける標的細胞傷害活性は、以下の式：

$$\text{LAK 活性\%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

によって、算出する。この式により算出した LAK 活性について、誘導サンプルと対照サンプルの値を互いに比較することにより、スクリーニング物質による in vitro での LAK 活性誘導能を測定することができる。

上述の最大解離、自然解離および実験解離を求める工程において、標的細胞の培養は、5% CO₂ にて 37℃ において行い、培養時間は、実験目的、使用する細胞の数、その他の条件に従って、当業者が適宜決定することができるが、本発明においては 3.5 時間培養する。

培養上清中に放出された ⁵¹Cr による放射線量は、シンチレーションカウンターなどを使用することにより測定することができる。

本発明の好ましい態様において、各工程は以下のとおりに実施するが、適切な変更および修飾がなされてよいことは、当業者には認識される。

培養したプレートから各ウェルの培養上清を採取し、シンチレーションカウンターにより放射活性を測定する。

- 5 上述のスクリーニング方法により *in vitro* における LAK 誘導活性が認められたシイタケ菌糸体抽出物を、3600mg/日で 7 日間、生体に投与して *in vitro* で LAK 活性を誘導した。上述のリンパ球回収方法により採取したリンパ球画分を使用し、上述の LAK 誘導サンプルの時と同様の条件下で LAK 活性%を測定したところ、*in vivo* での LAK 活性増強作用は *in vitro* において得られた結果と、正の相関を示すことがわかった。

- 10 本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これらはあくまで例示であって、本発明の範囲を限定するためのものではない。本発明の精神から逸脱することなく、本発明に対する様々な変更あるいは修飾がなされてよいことは、当業者には理解される。

実施例

15 実施例 1：シイタケ菌糸体抽出物の調製

- バガス 90 重量部、米糠 10 重量部からなる固体培地に純水を適度に含ませた後に、シイタケ種菌を接種し、温度および湿度を調節した培養室内に放置し、菌糸体を増殖させた。菌糸体が固体培地に密集した後、バガス基材の繊維素を解束し、12 メッシュ通過分が 24 重量%以下となるようにした。この解束された培地 1.0 kg
20 に、純水 3.5 L および精製セルラーゼ 2.0 g を、固体培地を 40℃ に保ちながら加えて培地含有混合物とした。

- 次いで、培地含有混合物を変速ギヤー付ポンプにより循環させながら、固体培地にギヤー部分において粉碎および擂潰作用を 200 分間程度加えて、バガス繊維の約 80 重量%が 12 メッシュ通過分となるようにした。培地含有混合物の粉碎および擂潰は、該混合物の温度を徐々に上昇させながら実施した。その後、培地含有混合物をさらに 90℃ まで加熱して酵素を失活せしめると同時に滅菌して、90℃
25 に 30 分間放置した。得られた培地含有混合液を 60 メッシュ濾布により濾過してシイタケ菌糸体抽出物とし、濃縮した後、凍結乾燥粉末を得た。

このようにして得られるシイタケ菌糸体抽出物はフェノールー硫酸法による糖

質分析により糖質を 25.3% (重量/重量)、ローリー法によるタンパク質分析によりタンパク質を 19.7% (重量/重量)、没食子酸を規準とする Folon-Denis 法によりポリフェノールを 2.6% (重量/重量) 含んでいた。シイタケ菌糸体抽出物には、その他に粗脂肪 8%、粗灰分 22%、糖質以外の可溶性無窒素物を約 20% 5 含んでいた。このうち、シイタケ菌糸体抽出物中の構成糖組成は以下のとおりであった。Xyl: 15.2; Ara: 8.2; Man: 8.4; Gul: 39.4; Gal: 5.4; GlcN: 12.0; GLuUA: 11.3。

実施例 2 : LAK 活性の測定

10 まず、被検体 A、B および C から、シイタケ菌糸体抽出物服用前の末梢血、および各被検体にシイタケ菌糸体抽出物 1200 mg を毎日 3 回、1 週間にわたって経口投与した後の末梢血を、それぞれ採血した。これらの末梢血から下記の方法により分離されるリンパ球画分を使用して、本発明の抽出物が生体内でリンパ球を活性化する能力と、抽出物を用いてリンパ球を *in vitro* で活性化する能力との相関 15 性についてスクリーニングすることができる。

まず、採取されたこれらの末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary 液 (s.g. =1.077) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離し、次いでこの分離された単核球を PBS (pH 7.4、Ca および Mg を不含) により 2 回洗浄したのち、 1×10^6 /ml になるように 10%FBS (非働化ウシ胎児血清) を培養液に添加した RPMI 20 1640 培地 (Gibco) に懸濁した。上述の方法により分離した細胞を、あらかじめ自己血清 (血漿) を用いて 37℃ で 15 分間処理してコートした培養皿に移し、37℃ で 1 時間培養した後に、非付着性の細胞をリンパ球画分として採取した。

10%FBS 添加 RPMI 1640 培養液中で培養した標的細胞である継代培養細胞 (Daudi 細胞) を遠心分離により回収し、 10^6 細胞当たり 100~150 μ Ci の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウム (New England Nuclear) を添加し、5%CO₂ 培養器にて 37℃ 25 において 1 時間培養した。 ^{51}Cr により標識された培養細胞を PBS により 3 回洗浄後、 1×10^6 /ml になるように 10%FBS 添加 RPMI 1640 培養液中に懸濁した。

マイクロタイタープレートの各ウェルに上述した方法で標識した標的細胞を 50 μ l (5×10^4 /ウェル) ずつ分注し、さらに、最大解離群 (陽性対照) には 1N-HCl

を 100 μ l ずつ分注し、自然解離群（陰性対照）には 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液を 100 μ l ずつ分注し、そして実験解離群には 10 μ g/ml の濃度の本発明のシイタケ菌糸体抽出物または対照としての 2000 U/ml の濃度の rIL-2 により刺激したエフェクター細胞（100 μ l（ 1×10^4 /ウェル）ずつ）を分注した。プレート遠心分離機により 800 rpm において 5 分間遠心処理して細胞をウェル底部に集めた後、5% CO₂ 培養器にて 37℃ において 3.5 時間培養した。

培養したプレートから SOKEN-PET Σ -96 にて各ウェルの培養上清を採取し、 γ -シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

LAK 活性は以下の表に従って算出した。

$$\text{LAK 活性\%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

結果を表 1 並びに図 1 に示す。

表 1:

実験番号	LAK 活性		
	被検体 A	被検体 B	被検体 C
1 服用前	13%	27%	14%
2 抽出物によるスクリーニング (最終濃度: 10 μ g/ml)	21%	34%	15%
3 抽出物服用後	40%	43%	15%

15 産業上の利用可能性

被検体 A および B において実際にシイタケ菌糸体抽出物を経口投与したところ、*in vivo* において LAK 活性が増強していることが確認された（表 1、実験 3 を参照）。これに対して本発明の抽出物を使用した *in vitro* でのスクリーニングでは、被検体 A および B の末梢血から採取したリンパ球を本発明の抽出物を用いて刺激した場合に、本発明の抽出物を被検体 A および B に直接経口投与した場合に得られる

LAK 活性の増強効果と正の相関を示す LAK 活性の増強効果が認められた（表 1、実験 2 を参照）。したがって、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を経口投与した際の LAK 活性の増強効果を、in vitro のスクリーニングで予測することができることが判明した。

- 5 一方、被検体 C において実際にシイタケ菌糸体含有物を経口投与したところ、in vivo においても LAK 活性が増強していないことが確認された（表 1、実験 3 を参照）。これに対して本発明の抽出物を使用した in vitro でのスクリーニングでは、被検体 C の末梢血から採取したリンパ球を本発明の抽出物を用いて刺激しても、本発明の抽出物を直接経口投与した場合に得られる LAK 活性の増強効果が
- 10 認められなかった（表 1、実験 2 を参照）。したがって、この例からも、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を経口投与した際の in vivo での LAK 活性増強効果を、in vitro でスクリーニングすることにより予測することができることが判明した。

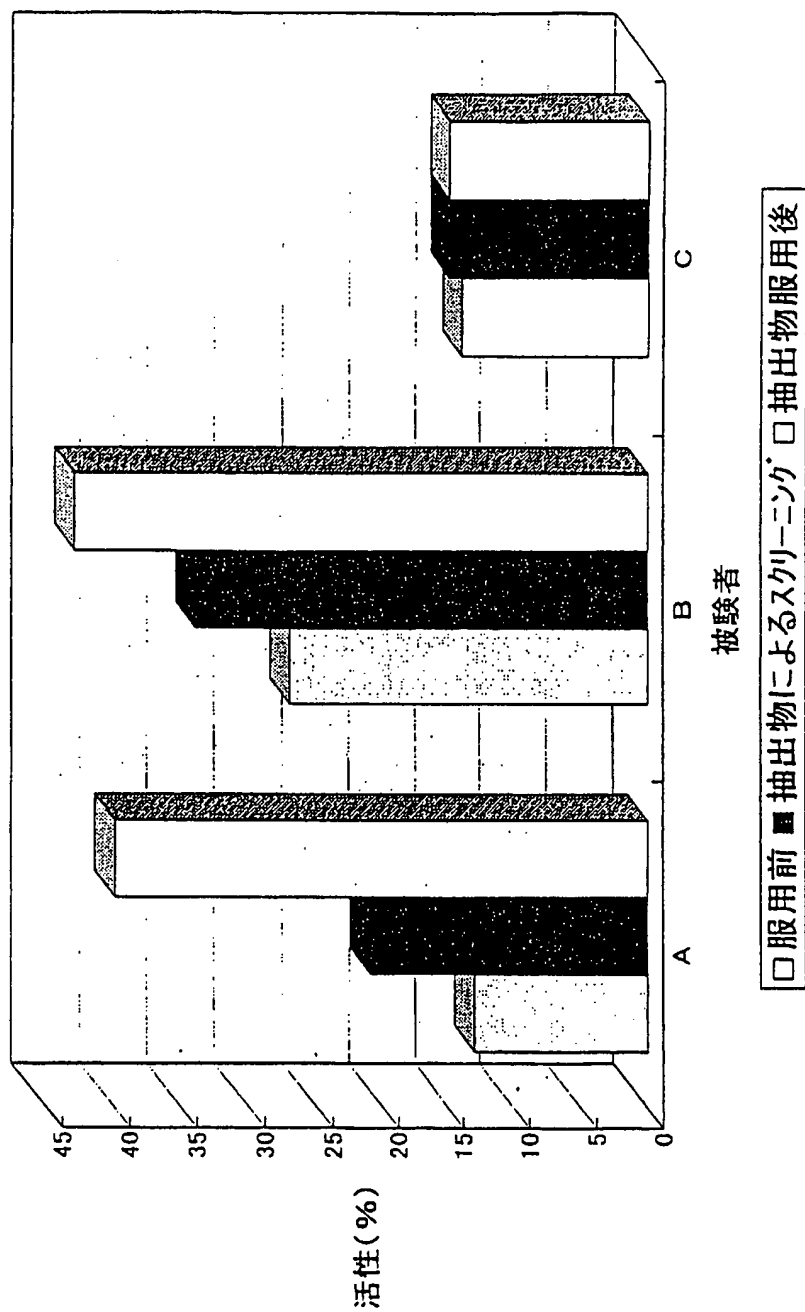
- よって、本発明の LAK 活性増強物質を生体に経口投与した場合の in vitro での LAK 活性の増強効果を、in vitro においてスクリーニング結果からより正確に予測することができることがわかった。これにより、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を直接投与した際の in vivo での LAK 活性増強効果を、当該 LAK 活性増強物質を直接投与する前に、in vitro で簡便に判断することができ、LAK 活性増強効果の期待できる被検体に対して、LAK 活性増強物質の効果的な投与を迅速に行うことができるだけでなく、LAK 活性増強効果の期待できない被検体に対しては、LAK
- 15 20 活性増強物質の無駄な投与を防止することができる。

また、本発明の方法では、被検体の血液から大量のリンパ球を採取することなく、LAK 活性増強物質の in vivo における治療効果を in vitro でスクリーニングすることができるので、被検体の肉体的負担も著しく軽減される。

請求の範囲

1. 以下の工程：
 - (a) 被検体の末梢血を採取して、これからリンパ球画分を調製すること；
 - (b) 前記リンパ球画分に本発明のスクリーニング物質を添加した LAK 誘導サンプルと、スクリーニング物質を添加しない対照サンプルを調製すること；
 - (c) 前記誘導サンプルと前記対照サンプルについて、LAK 活性を測定してそれらの結果を相互に比較することにより当該被検体に対するスクリーニング物質の *in vitro* での LAK 活性増強作用を決定すること；を含む、被検体に適した LAK 活性増強作用を有する物質を *in vitro* で決定する方法。
2. スクリーニング物質がシイタケ菌糸体抽出物である、請求項 1 に記載の方法。
3. 請求項 1 に記載の *in vitro* におけるスクリーニング方法に使用することにより、*in vivo* において LAK 活性を増強し得るかどうかをスクリーニングし得る、シイタケ菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質。
4. 請求項 2 に記載のスクリーニング物質を生体内に投与することによる、被検体の腫瘍を治療する方法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS
JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAGADEC P.F., "HUMAN SMALL-CELL LUNG-CANCER CELLS ARE CYTOKINE-RESISTANT BUT NK-LAK-SENSITIVE", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1991), VOL.48, NO.2, P.311-317	1~3
Y	K. Amino, "Hito rinpakuyu ni taisuru renchinkan no menneki fukatsu sayo ni tsuite", Gan to Kagaku Ryoho, (1981), Vol.8, No.6, pages 967-973	1~3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 February, 2000 (14.02.00)

Date of mailing of the international search report
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06615

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 4 corresponds to a method for treatment by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/15, 33/50		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/15, 33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2000年 日本国登録実用新案公報 1994-2000年 日本国実用新案登録公報 1996-2000年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS JOIS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LAGADEC P.F., "HUMAN SMALL-CELL LUNG-CANCER CELLS ARE CYTOKIN E-RESISTANT BUT NK-LAK-SENSITIVE", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1991), VOL. 48, NO. 2, P. 311-317	1~3
Y	網野光人, "ヒトリンパ球に対するレンチナンの免疫賦活作用について", 癌と化学療法, (1981), 第8巻, 第6号, 967-973	1~3
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14.02.00	国際調査報告の発送日 22.02.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏之 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 9015

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLPP.O. Box 747 • Falls Church, Virginia 22040-0747
Telephone: (703) 205-8000 • Facsimile: (703) 205-8050PLEASE NOTE:
YOU MUST
COMPLETE THE
FOLLOWING**COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY
FOR PATENT AND DESIGN APPLICATIONS**

As a below named inventor, I hereby declare that: my residence, post office address and citizenship are as stated next to my name; that I verily believe that I am the original, first and sole inventor (if only one inventor is named below) or an original, first and joint inventor (if plural inventors are named below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled:

Insert Title: LAK ACTIVITY-SCREENING MATERIALS CONTAINING LENTINUS EXTRACT OF EDODES MYCELIUM AND LAK ACTIVITY-SCREENING METHODS

Fill in Appropriate the specification of which is attached hereto. If not attached hereto, the application is identified by the attorney docket number as set forth above and/or the following:

Information - The specification was filed on May 25, 2001 as
For Use Without United States Application Number 09/856,716
Specification and amended on _____ (if applicable) and/or
Attached: the specification was filed on November 26, 1999 as PCT
International Application Number PCT/JP99/06615; and was
amended on _____ (if applicable)

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56.

I do not know and do not believe the same was ever known or used in the United States of America before my or our invention thereof, or patented or described in any printed publication in any country before my or our invention thereof or more than one year prior to this application, that the same was not in public use or on sale in the United States of America more than one year prior to this application, that the invention has not been patented or made the subject of an inventor's certificate issued before the date of this application in any country foreign to the United States of America on an application filed by me or my legal representative or assigns more than twelve months (six months for designs) prior to this application, and that no application for patent or inventor's certificate on this invention has been filed in any country foreign to the United States of America prior to this application by me or my legal representatives or assigns, except as follows.

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, §119(a)-(d) of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed:

Prior Foreign Application(s)

Priority Claimed

Insert Priority
Information:
(if appropriate)

<u>353926/1998</u> (Number)	<u>Japan</u> (Country)	<u>November 27, 1998</u> (Month/Day/Year Filed)	<input checked="" type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Month/Day/Year Filed)	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Month/Day/Year Filed)	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Month/Day/Year Filed)	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, §119(e) of any United States provisional applications(s) listed below.

Insert Provisional
Application(s):
(if any)

_____ (Application Number)	_____ (Filing Date)
_____ (Application Number)	_____ (Filing Date)

All Foreign Applications, if any, for any Patent or Inventor's Certificate Filed More than 12 Months (6 Months for Designs) Prior to the Filing Date of This Application:

Insert Requested
Information:
(if appropriate)

Country	Application Number	Date of Filing (Month/Day/Year)
_____	_____	_____
_____	_____	_____

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, §120 of any United States and/or PCT application(s), including for continuation-in-part application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States and/or PCT application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, §112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to the patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application.

Insert Prior U.S.
Application(s):
(if any)

_____ (Application Number)	_____ (Filing Date)	_____ (Status - patented, pending, abandoned)
-------------------------------	------------------------	--

I hereby appoint the practitioners at CUSTOMER NO. 02292 as my attorneys or agents to prosecute this application and/or an international application based on this application and to transact all business in the United States Patent and Trademark Office connected therewith and in connection with the resulting patent based on instructions received from the entity who first sent the application papers to the practitioners, unless the inventor(s) or assignee provides said practitioners with a written notice to the contrary:

Send Correspondence to:

CUSTOMER NO. 02292 (BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP)

Telephone: (703) 205-8000

Facsimile: (703) 205-8050

PLEASE NOTE:
YOU MUST
COMPLETE
THE
FOLLOWING:
↓

Full Name of First
or Sole Inventor:
Insert Name of
Inventor →
Insert Date This
Document is Signed

Insert Residence
Insert Citizenship →

Insert Post Office
Address →

Full Name of Second
Inventor, if any:
see above

Full Name of Third
Inventor, if any:
see above

Full Name of Fourth
Inventor, if any:
see above

Full Name of Fifth
Inventor, if any:
see above

Full Name of Sixth
Inventor, if any:
see above

GIVEN NAME/FAMILY NAME	INVENTOR'S SIGNATURE	DATE*
Kenji ASANO		
Residence (City, State & Country)	CITIZENSHIP	
Osaka, Japan	Japan	
MAILING ADDRESS (Complete Street Address including City, State & Country)		
c/o Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., of 3-13-35, Mitsuya Minami, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532-0035 Japan		
GIVEN NAME/FAMILY NAME	INVENTOR'S SIGNATURE	DATE*
Yukiko MATSUDA		
Residence (City, State & Country)	CITIZENSHIP	
Osaka, Japan	Japan	
MAILING ADDRESS (Complete Street Address including City, State & Country)		
c/o Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., of 3-13-35, Mitsuya Minami, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532-0035 Japan		
GIVEN NAME/FAMILY NAME	INVENTOR'S SIGNATURE	DATE*
Yutaka TAJIMA	X	X
Residence (City, State & Country)	CITIZENSHIP	
Saga, Japan	Japan	
MAILING ADDRESS (Complete Street Address including City, State & Country)		
10-511, Yaemizo 3-chome, Saga-shi, Saga 849-0935 Japan		
GIVEN NAME/FAMILY NAME	INVENTOR'S SIGNATURE	DATE*
Residence (City, State & Country)	CITIZENSHIP	
MAILING ADDRESS (Complete Street Address including City, State & Country)		
GIVEN NAME/FAMILY NAME	INVENTOR'S SIGNATURE	DATE*
Residence (City, State & Country)	CITIZENSHIP	
MAILING ADDRESS (Complete Street Address including City, State & Country)		
GIVEN NAME/FAMILY NAME	INVENTOR'S SIGNATURE	DATE*
Residence (City, State & Country)	CITIZENSHIP	
MAILING ADDRESS (Complete Street Address including City, State & Country)		

*DATE OF SIGNATURE